

ГУМИНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ СЕРТИФИКАЦИИ*

© 2011 г. О. С. Якименко¹, В. А. Терехова^{1, 2}

¹Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН 119071 Москва, Ленинский пр., 33

e-mail: ola-yak@mail.ru; vtterekhova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2010 г.

В связи с актуальностью проблемы сертификации структурно-функциональных свойств гуминовых препаратов обсуждается разнообразие откликов тест-организмов (высших растений, микроводорослей, простейших, ракообразных, бактерий и культуры клеток млекопитающих *in vitro*) на воздействие гуматов, полученных промышленным способом из разных видов сырья. В программу оценки биоактивности гуминовых препаратов методами лабораторного тестирования предлагается включать высшие растения (для оценки эффекта стимуляции) и “батарею” биотестов на основе тест-организмов разных трофических уровней (для определения токсичных концентраций).

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость биосферы к интенсивному антропогенному воздействию и ее способность к восстановлению в огромной степени обусловлены наличием в почве гуминовых веществ (ГВ). По своему генезису гуминовые вещества (ГВ) представляют особую предельную стадию физического, химического и микробиологического процессов трансформации органического вещества в природе. Уникальность их свойств и строения определяют почвообразовательные процессы и плодородие почв, а также разложение горных пород и минералов, связывание, фиксацию, концентрацию, рассеяние и переотложение химических элементов [6, 35]. Природные ГВ регулируют процессы роста растений, улучшают физико-химические свойства почвы, активизируют деятельность микроорганизмов, влияют на миграцию питательных веществ, стимулируют процессы дыхания, синтеза белков и углеводов, ферментативную активность.

В последние годы сильно возрос интерес к разным аспектам применения гуминовых веществ, в первую очередь, в растениеводстве, животноводстве, в охране природных сред от загрязнения и некоторых отраслях промышленности [5, 7, 8, 19, 25]. Промышленные гуминовые препараты (ГП), получаемые из природных ресурсов (угля, торфа, донных отложений, многотоннажных органических отходов и др.), в значительной степени наследуют свойства ГВ исходного сырья и поэтому по функциональной активности действуют как

мелиоранты и препараты для детоксикации, ремедиации и рекультивации деградированных и загрязненных почв, а также стимуляторы роста растений.

Технологии детоксикации загрязненных почв и грунтов с применением гуминовых и гумино-минеральных веществ главным образом основаны на инактивации поллютантов при внесении гуматов в загрязненные почвы и грунты путем связывания ионов тяжелых металлов, перевода их в неподвижные (водонерастворимые) формы, обезвреживания органических экотоксикантов при их сорбции на гуминовых матрицах [18, 24, 29]. Использование ГП для целей микробной и фиторемедиации почв связано, прежде всего, с тем, что гуматы обладают физиологической активностью по отношению к растениям и некоторым видам микроорганизмов, что вызывает стимулирование аборигенной микробиоты почв. Кроме того известно, что гуматы способны влиять на токсичность поллютантов как неорганической природы, в первую очередь, тяжелых металлов, так и некоторых органических соединений [9, 22, 38].

Наиболее широкое применение ГП находят в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста растений. В экспериментах с различными культурами высших растений показано, что применение промышленных гуматов натрия, калия и аммония, независимо от источника сырья для их производства, в оптимальных дозах заметно стимулирует прорастание семян, улучшает дыхание и питание растений, увеличивает длину и биомассу проростков, усиливает ферментативную активность и сокращает поступление в растения тяжелых металлов и радионуклидов [19, 21, 26, 39].

* Работа частично поддержана РФФИ (грант 07-04-01510) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (ГК 02.740.11.06993).

Этот эффект особенно заметен на ранних стадиях развития растений, но в отдельных случаях проявляется в течение всего онтогенеза, включая урожай растительной продукции.

Проявление биологической активности как природных ГВ, так и промышленных ГП наблюдается не только по отношению к высшим растениям — это явление в значительной степени универсальное для живых организмов: показано для бактерий [10, 37], грибов [11], водорослей [12, 13, 16], кормовых дрожжей [3, 23], рыб, теплокровных животных и птиц [8, 34]. Введение ГВ в питательные среды или пищевые рационы животных, птиц и рыб влияет на доступность и накопление в тканях металлов и ксенобиотиков [32, 33] и нивелирует физиологические последствия стрессов [4, 15, 27]. Это обуславливает применение промышленных ГП в качестве кормовых добавок в животноводстве, в аквариумистике, в гидролизной промышленности.

В то же время механизмы воздействия ГВ на живые организмы практически не изучены. Можно считать установленным, что стимулирующее влияние ГВ оказывают в области определенных, довольно низких концентраций (10^{-2} – $10^{-4}\%$), а в более высоких концентрациях проявляется ингибирующий эффект. Такая функция проявления отклика живых организмов характерна для биологически активных веществ. Хотя попытки идентификации гормонов в составе ГВ до сих пор не увенчались успехом, гормоно-подобная активность как природных ГВ, так и промышленных ГП не оставляет сомнений [17, 20, 28, 34].

Перечисленные факты обуславливают необходимость разработки эффективной методологии комплексной экологической диагностики ГП, в изобилии предлагаемых сегодня на рынке. Одной из важнейших характеристик их качества является степень экотоксичности, поскольку за счет гормоно-подобного характера влияния на живые организмы возможна не только стимуляция, но и угнетение развития представителей биоты. Известно, что чувствительность живых организмов к воздействию гуматов различается [16, 31, 36]. В той или иной степени это может быть связано с особенностями химической структуры гуминовых продуктов, произведенных из разных субстратов.

Разработка программы сертификации структурно-функциональных характеристик коммерческих гуминовых препаратов весьма актуальна. Предстоит решить непростую задачу по обоснованному выбору информативных методов, в частности, для биологической оценки ГП. Методические программы оценки биоактивности и экотоксичности ГП, производимых из разного сырья, в настоящее время уже активно и всесторонне обсуждаются не только экотоксикологами, но и химиками, специалистами, вовлеченными в произ-

водство коммерческих ГП. На заседании Круглого стола, специально организованного по инициативе председателя подкомиссии по органическому веществу почв Общества почвоведов им. В.В. Докучаева проф. С.Н. Чукова в рамках V Всероссийской конференции “Гуминовые вещества в биосфере” (1–4 марта 2010 г., Санкт-Петербург) такие программные вопросы уже были поставлены, состоялось обсуждение некоторых методических аспектов оценки биоактивности и химических характеристик ГП.

РАЗНООБРАЗИЕ ФОРМ ПРОМЫШЛЕННЫХ ГУМАТОВ

Коммерческие гуминовые препараты производятся в России и в ряде зарубежных стран многими предприятиями. Разнообразие коммерческих гуматов велико, действие их не подтверждено необходимыми сертификатами, поэтому о качестве этих стимуляторов приходится судить уже только после их приобретения. Состав и свойства ГП меняются в зависимости не только от источника гуминового сырья (торфа, угля и т.д.), но и от особенностей месторождения и технологии получения гуминовых продуктов. При условии определенного соответствия технологической схемы получения ГП на производстве лабораторным методам их выделения и при отсутствии намеренно введенных добавок (например, минеральных элементов), состав как самих промышленных гуматов, так и содержащихся в их составе собственно ГВ отражают генезис органического сырья и условия гумификации.

Разнообразие гуминовых продуктов иллюстрирует табл. 1, в которой приведены описания и базовые свойства некоторых изучаемых нами российских и зарубежных ГП. Препараты получены по промышленным технологиям из различных видов гуминовых ресурсов: углефицированных материалов, торфов и донных отложений, органических отходов; они представляют собой жидкие или порошковые гуматы натрия или калия с различными добавками: микроэлементами, минеральными удобрениями, кремниевой кислотой. Также, хотя и значительно реже, встречаются препараты фульвокислот.

В мировом производстве ГП преобладают препараты из углефицированных материалов: окисленного низкокалорийного бурого угля и соответствующего ему в англоязычной терминологии лигнита. Леонардит и гумалит также относятся к выветрелым окисленным бурым углям, часто ассоциированным с углистыми сланцами. Этими терминами иногда называют свое сырье производители гуминовых продуктов из стран Европы и России, хотя, строго говоря, к леонардиту относится определенное месторождение бурого угля в Северной Дакоте (США), а к гумалиту — в Аль-

Таблица 1. Состав и некоторые свойства ряда отечественных и зарубежных промышленных гуминовых препаратов

Название, страна	Источник	Указанный состав	pH*	C	N
				% СВ	
Препараты из углефицированных материалов					
Гумат-80, РФ	Бурый уголь	Гумат Na/K	10.5	43	0.3
Гумат 7+, РФ	»	Гумат К + микроэлементы	10.1	35	0.7
Энерген-экстра, РФ	»	Гумат К	9.9	49	0.3
Энерген-На, РФ	»	Гумат Na	10.1	43	2.2
Энергум, РФ	»	Гумат Na	9.4	39	2.4
Гуми, РФ	»	Гумат Na/K	8.2	43	0.4
USA, США	Лигнит	Гумат Na/K	9.0	40	0.4
ION-14, США	»	Гумат с добавкой монокремниевой кислоты	8.1	38	0.4
Сахалинский, РФ	Леонардит	Гумат Na/K	8.9	35	1.2
Humisol, Италия	»	80% гумат + фульват	7.8	41	0.5
Row-Humus, Германия	»	Гумат К	9.9	43	1.0
HFA WDG 70, США	»	Сухая 70% ГК	7.6	43	0.6
HFA WP 80, США	»	Сухая 80% ГК	7.8	41	1.0
Soluble product -IL Humic G-F-P-K, США	»	Гумат с добавкой минеральных удобрений	7.5	27	0.6
Soluble product -IL Humic G-K, США	»	Гумат с добавкой минеральных удобрений	7.2	32	0.3
SP-85, США	»	85% растворимый гумат	8.3	45	1.0
SP-100, США	»	100% растворимый гумат Na/K	8.1	48	1.2
BorreGro HA-1, США	»	Кислоторастворимый гумат	7.4	35	0.8
Dry-soluble, США	»	Гумат	8.0	38	0.8
Liquid Fulvic, США	»	Жидкая ФК	2.5	Не опр.	
Organo Liquid Humic, США	»	Жидкая ГК	8.8	»	
Препараты из торфа и донных отложений					
Плодородие, РФ	Торф + сапрпель	Гумат К/Na	9.9	33	1.5
Бигус, РФ	Сапрпель	Гумат К	8.9	32	1.7
Эдагум, РФ	Торф	Гумат Na + кремниевая кислота	11.3	38	1.9
Скарабей, РФ	»	Гуминовая кислота	2.7	48	1.4
Флексом, РФ	»	Гумат К	8.9	42	1.1
ЭкоОрганика, РФ	»	Гумат К	8.1	36	1.5
Препараты из органических отходов					
Лигногумат (Na) , РФ	Лигносульфат	Гумат Na	10.2	37	0.5
Лигногумат А (К) , РФ	»	Гумат К	9.9	36	0.3
Лигногумат АМ (К) , РФ	»	Гумат К + микроэлементы	9.5	34	0.2
Гумистар, РФ	Вермикомпост	Биогумус	9.0	44	1.7
Источник неизвестен					
Chinese Humate, Китай	Нет данных	80% гумат Na/K	9.4	53	0.6
Humisolve-CZ, Чехия	»	60% К- гумат	9.1	42	0.7
India 90% soluble, Индия	»	Нет данных	8.6	25	0.2
Tha	»	Гумат К	7.6	27	0.8
Sol 80% HA + K powder, США	»	80% К- гумат	8.9	45	0.2
70% FA powder, США	»	Фульвокислота	7.1	33	2.5

Примечание: СВ – сухое вещество.

* pH определен при концентрации препарата 1 г/л.

берте (Канада). ГП из торфов и сапропелей наиболее популярны на российском рынке и в странах, богатых торфяными месторождениями.

Специфика гуминовых ресурсов состоит в том, что в ряду каустобиолитов торф и сапрпель являются самыми молодыми ископаемыми, частично сохранившими фрагменты структуры растительной ткани. Вероятно, благодаря наличию остатков протеинов ГП из торфа и сапропеля содержат, как правило, в 1,5–2 раза больше азота, чем препараты из углей, а за счет остатков сахаридов – примерно равное количество гуминовых кислот и веществ кислоторастворимой фракции (**КРФ**) органического вещества, в том числе фульвокислот. Углефицированные материалы в процессе диагенеза проходят глубокие стадии гумификации и углефикации, приводящие к накоплению конденсированных ароматических структур и потере протеинов, углеводов и алифатических фрагментов. Поэтому по сравнению с ГП из торфа препараты из углей содержат наибольшее количество углерода и наименьшее – водорода и азота, а в составе органического вещества доминируют гуминовые кислоты [40]. Что касается ГП из органических отходов, то их свойства определяются главным образом составом сырья и собственно технологией их получения.

Таким образом, наряду с определенной общностью строения, ГП, полученные из сырья, сформировавшегося в различных условиях трансформации и гумификации биомассы, обладают индивидуальными свойствами. Поэтому особенности воздействия ГП на живые тест-системы будут определяться не только чувствительностью организмов и заданными условиями эксперимента, но и составом ГП, который, в свою очередь, во многом определяется генезисом органического сырья.

НЕОБХОДИМЫЕ И ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ГУМАТОВ

Для достоверной оценки биологической активности гуминовых препаратов, используемых, прежде всего, для нужд сельского хозяйства, необходимо, на наш взгляд, реализовывать схему экспериментальной проверки, включающую разные способы фитотестирования на высших растениях (от лабораторного до микрополевого). Но наряду с этим, важно иметь подтверждение экологической безопасности (характеристику экотоксичности) промышленных гуматов по отношению к живым организмам – представителям основных трофических уровней, обеспечивающим устойчивое функционирование природных экосистем и агроценозов.

Биотестирование – необходимый этап оценки стимулирующей активности и экологической безопасности не только самих ГП, используемых в растениеводстве и сельском хозяйстве, но полезная процедура для характеристики их детоксицирующего эффекта при применении в целях ремедиации природных и техногенных объектов – загрязненных почв, вод или токсичных отходов [9, 18].

Принято считать, что биотестирование дает информацию о неблагоприятии в опережающем режиме, до проявления видимых (индицируемых) изменений в природных экосистемах. Методы биотестирования, как правило, обладают высокой чувствительностью, улавливают более низкие концентрации веществ, чем аналитические датчики. В качестве метода, дополняющего биоиндикацию и химико-аналитический комплекс, биотестирование обладает рядом несомненных достоинств, к числу которых относится интегральность отклика биологических систем [1, 14]. Очевидно, что по информативности для прогнозирования последствий вредного воздействия на окружающую природную среду они превосходят физико-химические методы анализа. В тест-реакции суммируется действие всех биологически вредных факторов, включая физическое и химическое воздействие, а также воздействие присутствующих биотических факторов.

Надо отметить, что многообразие форм и целей применения ГП делает непростым вопрос адекватного выбора тест-системы для оценки безопасности этих веществ. В качестве основы для оценки биобезопасности промышленных ГП, последствий их воздействия на природные среды, можно рассматривать стандартизованные методики биотестирования, рекомендованные органами государственного экологического контроля для целей токсикологического контроля почв, вод и других объектов. В настоящее время перечень актуализированных методик биотестирования, являющихся национальными стандартами невелик, всего около десяти. В федеральных реестрах России в настоящее время насчитывается около десятка токсикологических методик выполнения измерений (**МВИ**) и, соответственно, биотест-систем, рекомендованных для применения в сфере охраны природы и экологического контроля. Они основаны на тест-реакциях бактерий, простейших, ракообразных, млекопитающих, и микроводорослей, то есть охватывают все основные звенья трофической биоценотической цепи (деструкторов, консументов, продуцентов).

Как показали наши исследования, существенную проблему в разработке программы экологической оценки гуминовых препаратов, может составить вариабельность “откликов” стандартизованных культур. Факторы, определяющие различия в

Таблица 2. Происхождение и некоторые свойства гуминовых препаратов

Сырьевой источник ГП	Обозначение ГП	рН	Зольность	N общ	C общ	S общ
			%			
Бурый уголь	BC-EnNa	9.0	18.4	1.13	43.6	0.6
Леонардит	Le-PhK	9.5	28.5	0.87	39.0	2.7
Лигнит	Li-Ion	10.2	36.1	0.79	34.8	0.7
Сапропель	Sa-Plod	9.5	28.3	1.81	34.6	0.6
Органический отход	Ow-LhNa	10.1	32.2	0.35	34.6	3.7

Таблица 3. Содержание углерода и гуминовых веществ в водной вытяжке из гуминовых препаратов

Препарат	C _{H₂O}	C _{ГК}	C _{КРФ}	C _{H₂O} /C общ	C _{КРФ} /C общ	C _{КРФ} /C общ
BC-EnNa	$\frac{18.1}{100}$	$\frac{13.5}{75}$	$\frac{4.6}{25}$	0.42	0.31	0.11
Le-PhK	$\frac{23.3}{100}$	$\frac{18.6}{80}$	$\frac{4.7}{20}$	0.60	0.48	0.12
Li-Ion	$\frac{15.0}{100}$	$\frac{11.9}{79}$	$\frac{3.1}{21}$	0.43	0.34	0.09
Sa-Plod	$\frac{18.1}{100}$	$\frac{9.5}{52}$	$\frac{8.6}{48}$	0.52	0.27	0.25
Ow-LhNa	$\frac{24.2}{100}$	$\frac{2.3}{10}$	$\frac{21.9}{90}$	0.70	0.07	0.63

Примечание: над чертой – процент от сухого вещества; под чертой – процент от C_{H₂O}.

отклика тест-организмов разной таксономической принадлежности на воздействие ГП, исследованы не в полной мере. Тем не менее, на основании полученных данных можно говорить о влиянии условий экспозиции, в частности, насыщенности среды культивирования питательными компонентами, на ответную реакцию тест-организмов, об определенной взаимосвязи источников происхождения коммерческих гуматов (вида сырья) и проявлением тест-реакций организмов [12, 13, 36].

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В наших исследованиях, посвященных сравнительному изучению токсичности ГП, была использована выборка из коллекции отечественных и зарубежных препаратов кафедры химии почв МГУ. Исследуемые в этом опыте ГП получены фирмами-производителями промышленным способом из трех групп органического сырья: углефицированных материалов различной степени окисленности (бурого угля, леонардита и лигнита), озерных донных отложений (сапропеля) и промышленного органического отхода лигносульфоната (табл. 2). Все они позиционируются в

качестве стимуляторов роста растений и почвенных кондиционеров.

Как видно из табл. 2 и 3, препараты довольно сильно различаются как по составу, так и по соотношению собственно гуминовых кислот и фульвокислот (в смеси с другими веществами КРФ). Так, ГП из углей (BC-EnNa, Le-PhK, Li-Ion) содержат наибольшее количество углерода и наименьшее – азота, а в составе водной вытяжки доминируют гуминовые кислоты, составляя 75–80% от водорастворимого органического вещества. Препарат из сапропеля Sa-Plod содержит наибольшее количество азота и примерно равное количество гуминовых кислот и веществ КРФ. ГП из органического отхода получен в ходе так называемой искусственной гумификации лигносульфоната, и наследует от сырья очень низкое содержание азота, высокое – серы (около 4%) и резкое преобладание фульвокислот и веществ КРФ над гуминовыми кислотами: 90 и 10% соответственно.

Эти особенности состава ГП могут обуславливать их различное влияние на тест-организмы, поскольку механизм проявления гуминовыми веществами экотоксичности, очевидно, связан в том числе и с их химическим строением, которое

определяется, в свою очередь, их генезисом. Результаты экспериментов по биотестированию показали, что некоторые тест-культуры сходным образом реагировали на действие всех гуматов, в то время как чувствительность других на присутствие ГП разного происхождения значительно различалась.

Биотестирование водных растворов ГП проводили в широком диапазоне концентраций 5–10000 мг/л с целью выявления как стимулирующего, так и ингибирующего эффектов на высших растениях (редис *Raphanus sativa*), клетках теплокровных животных *in vitro*, низших ракообразных (*Daphnia magna*), простейших (*Paramecium caudatum*), бактерий (аналитическая система “Биотокс”) и микроводорослях (*Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda*). Обобщая полученные результаты, частично опубликованные ранее, можно констатировать следующее.

При фитотестировании на высших растениях в лабораторных условиях, заключающемся в обработке семян растворами ГП, их проращивании в темноте при 27°C и регистрации биометрических показателей 3-дневных проростков, получены более или менее предсказуемые результаты. ГП при относительно низких концентрациях оказывали стимулирующий эффект на прорастание семян и рост корней. При высоких концентрациях ГП стимуляция не наблюдалась, а в ряде случаев отмечен эффект ингибирования роста растений. Однако динамика тест-откликов для разных ГП описывалась разными характерными кривыми “доза-эффект” (рис., IA). Четкой корреляции между составом ГП и откликом растений выявить не удалось [39], однако влияние индивидуальных свойств препаратов кажется несомненным.

Испытание ГП в культуре клеток теплокровных *in vitro* на основе методики выполнения измерений индекса токсичности по изменению подвижности половых клеток млекопитающих с помощью видеоанализатора (ФР.1.31.2009.06301), в концентрациях, оказывающих стимулирующий эффект на растения (50–200 мг/л), показало их безопасность для клеток теплокровных животных. Индекс токсичности находился в пределах установленного методикой диапазона, соответствующего оптимальной подвижности сперматозоидов ($80 < \text{Ит} < 120$) (рис., IB). Эта тест-культура показала сходные отклики на все виды ГП – они оказались малочувствительными к действию гуматов как угольного, так и другого происхождения в исследуемом диапазоне концентраций.

На тест-культуру простейших – равноресничных инфузорий *P. caudatum* ГП в концентрациях 5–100 мг/л также не оказывали токсического действия. Парамеции в присутствии ГП обнаружили хорошую выживаемость – Ит не выходил за пределы 50%, что свидетельствует, согласно установлен-

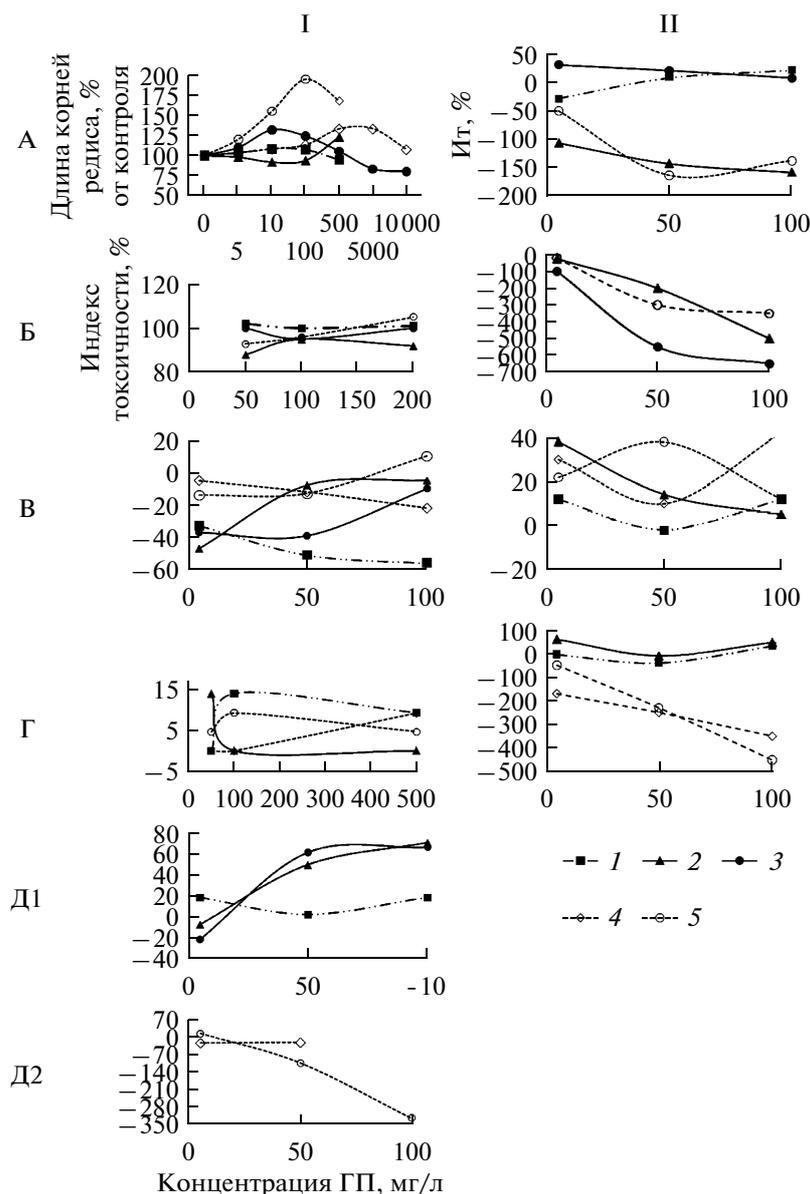
ным методикой критериям, об отсутствии вредного воздействия (ФР.1.39.2006.02506) (рис., IB).

Стандартная оценка острой токсичности с использованием ракообразных *D. magna* (ФР.1.39.2007.03222) показала, что установленный методикой рубеж индекса токсичности (50-процентная смертность особей) при исследовании ГП в диапазоне концентраций 50–500 мг/л не был превышен, что свидетельствует об отсутствии острой токсичности в пробах (рис., IG).

Влияние ГП на бактерии определяли по изменению интенсивности люминесцентного свечения генномодифицированной культуры (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04) с применением биосенсора “Эколюм”. Согласно этой методике, оценки ранжируются по трем группам: “нетоксичные” ($20 < \text{Ит} < 50$) и “высоко токсичные” ($\text{Ит} > 50$). Бактериальные культуры оказались более чувствительными к ГП, и показали селективные отклики в зависимости от состава (происхождения) гуматов. Так, ГП из бурого угля BC-EnNa во всем диапазоне концентраций (5–100 мг/л) не оказывал токсического действия на тест-культуру ($\text{Ит} < 20$), тогда как два других препарата из аналогичного сырья – Le-PhK и Li-Ion – не проявляли токсичности только при самой низкой концентрации, а при более высоких характеризовались высокой токсичностью ($\text{Ит} > 50$) (рис., ID1). Сходный эффект токсичности растворов гуминовой кислоты угля для этих штаммов бактерий в концентрациях 60–120 мг/л описан в литературе [2]. В отличие от ГП из углей, гуматы из более “молодого” сырья (Sa-Plod из сапропеля и особенно Ow-LhNa из лигносульфоната), демонстрировали совсем иное воздействие на бактериальную культуру: наблюдалось не только отсутствие токсичности при всех испытанных концентрациях ($\text{Ит} < 20$), но и стимуляция свечения бактериального препарата относительно контроля (рис., ID2). Возможно, это связано с различиями в химической структуре ГП, в частности, повышенным содержанием веществ КРФ в препаратах из сапропеля и органического отхода.

Влияние ГП на микроводоросли двух видов – *C. vulgaris* и *S. quadricauda* – оценивали для концентраций 5–100 мг/л прямым учетом изменения прироста численности клеток в популяциях, модифицируя в ряде случаев стандартные методы определения токсичности по изменению оптической плотности культуры водоросли хлореллы (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04) и определения токсичности по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей (ФР.1.39.2007.03223).

В тестах с водорослями, как и в тестах с бактериальной культурой, ГП демонстрировали разный эффект в зависимости как от своего генезиса, так и от состава питательной среды (рис., II).



Кривые зависимости доза-эффект при воздействии ГП на тест-культуры разных видов (I): А — высшие растения (семена редиса); Б — половые клетки млекопитающих (быка) *in vitro*; В — простейшие (инфузории парамеции); Г — дафнии; Д1 и Д2 — бактерии (генномодифицированная люминесцентная культура) и на протококковые микроводоросли (II): А — хлорелла в 2%-ной среде Тамия; Б — хлорелла в 25%-ной среде Тамия; В — сценедесмус в 100%-ной среде Успенского; Г — сценедесмус в 10% среде Успенского. Условные обозначения: 1 — BC-EnNa; 2 — Li-Ion; 3 — Le-PhK; 4 — Sa-Plod; 5 — OW-LhNa.

Рост хлореллы при культивировании в стандартных условиях (среда Тамия в концентрации 2%) и введении ГП, как правило, стимулировался сверх границы токсичности (Ит < -30), хотя в отдельных случаях или угнетался (Ит > 20 для препарата из угля Le-PhK), или находился в пределах допустимых колебаний (рис., ПА). При увеличении насыщенности среды Тамия питательными элементами до 25% гуматы еще сильнее стимулировали развитие культуры, причем стимулирующее действие препарата Le-PhK, проявлявшего инги-

бирование развития клеток в стандартных условиях, было наибольшим в условиях избытка питательных элементов (рис., ПБ). Кроме того, для всех ГП наблюдалась прямая зависимость между концентрацией и стимулирующим эффектом.

В отличие от отклика хлореллы *S. quadricauda* не реагировал усилением роста на введение ГП при культивировании в стандартных условиях (среда Успенского-1), наоборот, в отдельных случаях наблюдалось проявление токсичности (рис., ПВ). Четкой зависимости между концентрацией ис-

следуемых ГП и их воздействием на культуру водорослей не прослеживалось; и также на этом фоне не удавалось выявить определенных различий в действии ГП разного происхождения. Однако при уменьшении питательности среды путем разбавления среды Успенского в 10 раз проявлялся более дифференцированный отклик тест-культуры на ГП из различного сырья: обогащенные ГК препараты из углей BC-EnNa и Li-Ion оказывали наибольший стимулирующий эффект при дозе 50 мг/л и ингибирующий – при дозах 5 и 100 мг/л; в то время как ГП из молодого сырья, обогащенные веществами КРФ (Sa-Plod и OW-LhNa), стимулировали развитие клеток микроводорослей в прямой зависимости от концентрации гуматов (рис., ПГ).

Результаты этих экспериментов, показывающие, что на результат биотестирования влияют как минимум два фактора: обогащенность сред и состав ГП, подробно изложены в статьях Федосевой с соавт. [12, 13].

Таким образом, из проанализированных данных следует, что биотестирование ГП различного происхождения с применением набора стандартных тест-систем обнаруживает разную чувствительность видов тест-организмов к ГП; при этом отдельные биотест-системы в зависимости от степени насыщенности среды питательными компонентами дают дифференцированный отклик на ГП разного генезиса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные литературные и экспериментальные данные свидетельствуют, что чувствительность разных видов тест-организмов к ГП не одинакова. Биотестирование с использованием шести тест-систем позволило выявить специфику реакции организмов – представителей различных трофических уровней.

Тест-системы с использованием семян высших растений, как правило, обнаруживают ауксиноподобный эффект разной степени выраженности. Поэтому для оценки биологической активности ГП в отношении стимуляции роста высших растений в качестве надежного инструмента оценки можно рекомендовать лабораторные методы по универсальному для объективного сравнения качества всех ГП виду (или набору видов) растений. В зарубежных стандартах предлагают набор из трех видов растений, сочетающих виды однодольных и двудольных растений [30].

Тест-системы с использованием клеток теплокровных животных, инфузорий и дафний оказались малочувствительны к воздействию ГП в исследованном диапазоне концентраций; а в бактериальной тест-системе получены дифференцированные отклики на воздействие ГП различного генезиса,

что, по всей видимости, связано с особенностями химического строения гуматов.

В тест-системах с применением микроводорослей фиксируются различия в откликах в зависимости не только от вида тест-культуры, но и насыщенности среды роста питательными элементами, а также генезиса ГП.

Таким образом, в программы по оценке биологической активности ГП следует включать «батареи» биотестов, сформированных из тест-систем на основе реакции высших растений и некоторых стандартизованных тест-организмов других трофических уровней.

Помимо этого, с учетом специфического воздействия на живые организмы гуматов из «молодого» и «зрелого» сырья, а также зависимости реакции отдельных видов от состава среды экспозиции при биотестировании, следует продолжить исследования особенностей откликов тест-культур разных видов с целью оптимизации условий проведения испытаний ГП разного происхождения. Для сопоставления как стимулирующего развития высших растений эффекта, так и сравнительной оценки экотоксичности, вероятно, следует разработать своего рода «стандартные» ГП из традиционных и наиболее распространенных видов сырья (уголь, торф, сапрпель), чтобы иметь определенные точки отсчета для характеристики новых ГП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / Под ред. О.П. Мелиховой и Е.И. Егоровой. М.: Академия, 2007. 288 с.
2. Бирюков М.В. Биолюминисцентный метод тестирования в исследовании гуминовых кислот // Тр. IV междунар. конф. Гуминовые вещества в биосфере. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2007. С. 124–128.
3. Дашницыренова А.Д., Калабин Г.А., Пройдаков А.Г. Стимуляция биоконверсии глюкозы в этанол гуминовыми веществами окисленных бурых углей // Химия в интересах устойчивого развития. 2006. № 2. Т. 14. С. 199–204.
4. Куликова Н.А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов. Дис. ... докт. биол. н. М., 2008. 48 с.
5. Лиштван И.И., Абрамец А.М. Гуминовые препараты и охрана окружающей среды (К использованию в качестве удобрений) // Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993. С. 126–139.
6. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ // Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993. С. 16–27.
7. Перминова И.В. Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века // Химия и жизнь. 2008. № 1. С. 50–55.

8. Степченко Л.М., Ефимов В.Г., Лосева Е.А., Скорик М.В. Использование гуминовых препаратов при получении биопродукции // Тр. IV междунар. конф. Гуминовые вещества в биосфере. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2007. С. 520–527.
9. Терехова В.А., Яковлев А.С., Каниськин М.А. Снижение экологической токсичности химических отходов при обработке их гуматами // Химия и нефтехимия. 2007. № 4 (10). С. 4–7.
10. Тихонов В.В., Якушев А.В., Завгородняя Ю.А., Бызов Б.А., Демин В.В. Действие гуминовых кислот на рост бактерий // Почвоведение. 2010. № 3. С. 333–341.
11. Федосеева Е.В., Пацаева С.В., Терехова В.А. Влияние гумата калия на некоторые физиологические характеристики микроскопических грибов разной пигментации // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 3. С. 243–249.
12. Федосеева Е.В., Терехова В.А., Якименко О.С., Гладкова М.М. Экоотоксикологическая оценка гуминовых препаратов разного происхождения с применением микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 4. С. 45–50.
13. Федосеева Е.В., Терехова В.А., Якименко О.С., Гладкова М.М. Эффект гуминовых препаратов на *Chlorella vulgaris* в зависимости от насыщенности среды культивирования питательными компонентами // Тр. V Всерос. конф. Гуминовые вещества в биосфере / Под ред. Б.Ф. Апарина. Ч. 1. СПб.: Издательский дом СПбГУ, 2010. С. 469–474.
14. Филенко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. М.: Колос, 2007. 144 с.
15. Христева Л.А. Действие физиологически активных гуминовых кислот на растения при неблагоприятных внешних условиях // Гуминовые удобрения: теория и практика их применения. Днепропетровск, 1973. Т. 4. С. 15–23.
16. Чуков С.Н., Голубков М.С. Сравнительное изучение физиологической активности гумусовых кислот почв на культуре водорослей *Chlorella vulgaris* // Вестник С.-Петербург. ун-та. 2005. № 1. Сер. 3. С. 103–113.
17. Чуков С.Н., Талашкина В.Д., Надпорожская М.А. Физиологическая активность ростовых стимуляторов и гуминовых кислот почв // Почвоведение. 1995. № 2. С. 169–174.
18. Шульгин А.И. Гуминовые вещества и проблема утилизации осадков сточных вод // Экологический вестник Москвы. 1994. Вып. 8. С. 40–45.
19. Якименко О.С. Промышленные гуминовые препараты: перспективы и ограничения использования // Мат-лы 2-й Междунар. научно-практической конф. “Дождевые черви и плодородие почв”. 17–20 марта 2004. Владимир, 2004. С. 249–252.
20. Chen Y., Aviad T. Effects of humic substances on plant growth // Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Reading / Eds.: P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcolm, and P.R. Bloom. Madison: Soil Sci. Soc. Am. 1990. P. 161–186.
21. Clapp C.E., Chen Y., Hayes M.H.B. Cheng H.H. Plant growth promoting activity of humic substances // Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters / Eds.: R.S. Swift and K.M. Sparks. Madison: International Humic Science Society. 2001. P. 243–255.
22. Fejficova D., Snajdr J., Siglova M., Cejkova A., Masak J., Jirku V. Influence of humic acids on the growth of the microorganisms utilizing toxic compounds (comparison between yeast and bacteria) // Chimia. 2005. V. 59. P. 749–752.
23. Hassett D.J., Bisesi M., Hartenstein R. Humic acids: synthesis, properties and assimilation of yeast biomass // Soil Biology & Biochemistry. 1988. V. 20 (2). P. 227–231.
24. Kaschl A., Chen Y. Interaction of humic substances with trace metals and their stimulatory effects on plant growth // Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: from Theory to Practice / Eds.: I.V. Perminova, K. Hatfield, N. Hertkorn. NATO Science Series: IV. Earth and Environmental Sciences. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 2005. V. 52. P. 83–114.
25. Lobartini J.C., Tan K.H., Rema J.A., Gingle A.R., Pape C., Himmelsbach D.S. The geochemical nature and agricultural importance of commercial humic matter // Science of the Total Environment. 1992. V. 113. № 1/3. P. 1–15.
26. Malcolm R.L., Vaughan D. Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues // Soil Biology & Biochemistry. 1978. V. 11. P. 65–72.
27. Meinelt T., Playle R.C., Pietrock M., Burnison B.K., Wienke A., Steinberg C.E.W. Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances // Aquatic Toxicology. 2001. V. 54. P. 205–215.
28. Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. Physiological effects of humic substances on higher plants // Soil Biology and Biochemistry. 2002. V. 34. № 11. P. 1527–1536.
29. Perminova I.V., Kulikova N.A., Zhilin D., Grechischeva M., Kovalevskii D.V., Lebedeva G.F., Matorin D. N., Venediktov P.S., Konstantinov A.I., Kholodov V.A., Petrosyan V.S. Mediating effects of humic substances in the contaminated environments. concepts, results, and prospects // Viable Methods of Soils and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation. Netherlands: Springer, 2006. P. 249–273.
30. Persoone G., Wadhia K. Comparison between toxtkit microbiotests and standard tests // Ecotoxicological characterization of waste: results and experiences of an international ring test. 2009. Part 3. P. 213–223.
31. Prokhotskaya V.Yu., Steinberg C.E.W. Differential sensitivity of a coccal green algal and cyanobacterial species to dissolved organic matter (NOM) // Env. Sci. Pollut. Res. 2007. № 8. P. 1–8.
32. Sanchez-Marin P., Lorenzo I., Blust R., Beiras R. Humic acids increase dissolved lead bioavailability for marine invertebrates // Environ. Sci. Technology. 2007. V. 41. № 16. P. 5679–5684.
33. Stackhouse R.A., Benson W.H. The influence of humic acid on the toxicity and bioavailability of selected trace metals // Aquatic Toxicology. 1988. V. 13 (2). P. 99–107.

34. *Steinberg C.E.W., Höss S., Kloas W., Lutz I., Meinelt S., Pflugmacher S., Wiegand C.* Hormonelike effects of humic substances on fish, amphibians, and invertebrates // *Environmental toxicology*. 2004. V. 19. № 4. P. 409–411.
35. *Tan K.H.* Humic matter in soil and the environment: principles and controversies. CRC Press, 2003. 386 p.
36. *Terekhova V., Poputnikova T., Fedoseeva E., Rakhleeva A., Vavilova V., Kaniskin M., Timofeev M., Ibatullina I., Yakovlev A.* Biotic control of humic substances ecotoxicity and their remediation effect in contaminated environment // *From Molecular Understanding to Innovative Applications of Humic Substances*, Proc. of 14th International Meeting of the International Humic Substances Society (IHSS) 14–19 Sept. 2008 (IHSS-14). P. 685–690.
37. *Vallini G., Pera A., Agnolucci M., Valdrighi M.M.* Humic acids stimulate growth and activity of in vitro tested axenic cultures of soil autotrophic nitrifying bacteria // *Biology and Fertility of Soils*. 1997. V. 24. P. 243–248.
38. *Van Stempvoort D.R., Lesage S., Novakowski K.S., Millar K., Brown B., Lawrence J.R.* Humic acid enhanced remediation of an emplaced diesel source in groundwater. 1. Laboratory-based pilot scale test // *J. Contaminant Hydrol.* 2002. V. 54. P. 249–276.
39. *Yakimenko O.* Chemical and plant growth stimulatory properties in a variety of commercial humates // *Humic substances - linking structure to functions* / Eds.: F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun. Proc. of 13th Meeting of the Int. Humic Substances Society. Karlsruhe, 2006. V. 45-II. P. 1017–1021.
40. *Yakimenko O., Izosimov A.* Structure and properties of humates from coalified materials, peat and sapropel // *Humic Substances in Ecosystems-8*, Abst. Int Conference, Slovakia, Soporna, 13–16 Sept 2009. P. 43–45.